

人体上皮细胞系(株)间交叉污染的检测*

张荣兴 师双平** 朱德厚 葛锡锐
(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

细胞系(株)间的交叉污染,严重威胁着细胞系(株)的质量控制。特别是 HeLa 细胞的污染是世界性的棘手问题。美国典型培养物保藏中心(ATCC)用 A 型 G 6PD 同功酶法,染色体 G 带分析和 Y 染色体的奎纳克林荧光技术证明:口腔表皮样癌细胞(KB),张氏肝细胞系(Chang Liver),人胚小肠细胞系(Intestin 407)等 15 个细胞系均被 HeLa 细胞所污染^[1-3]。Nelson Rees 也用类似的方法证明:胚肾细胞系(HEK),乳癌细胞系(HBT-3)和转化的前列腺癌(MA 160)等细胞系事实上已是宫颈癌来源的 HeLa 细胞^[4]。

角蛋白丝是上皮细胞特有的中间丝,人角蛋白是一个由近 30 个水不溶性细胞骨架蛋白组成的蛋白族(family)^[5,6],其中软角蛋白多肽组成多达 19 种,其分子量范围在 40—70 kd 之间,等电点在 4.8—7.8 之间。各种上皮细胞的角蛋白丝的详细成分和结构取决于细胞的类型,生长环境,发育分化阶段及疾病状态^[7]。另外,有些上皮细胞的角蛋白丝在有丝分裂过程中或在 0℃处理时可产生可逆的结构转化(structural transformation)^[8,9]。即细胞在有丝分裂过程中或 0℃处理时,角蛋白丝转化成角蛋白胞质小体,而在有丝分裂结束后或回复到 37℃时,角蛋白胞质小体又可逆地转化成角蛋白丝。为此,我们采用 SDS-PAGE,免疫印迹,单抗免疫荧光染色和角蛋白丝结构转化观察等方法对人体上皮细胞系(株)间的交叉污染的检测方法进行了初步探索。

材料和方 法

1. 细胞

人表皮癌细胞(PcaSE-1)和鼻咽癌细胞(CNE)来自北京中国医学科学院肿瘤所。HeLa 细胞,肝癌细胞(BEL-7402 和 BEL-7404),卵巢癌细胞(HO-8901),胃癌细胞(SGC-7901)和表皮癌细胞(A 431)等均来自本细胞库。

2. 抗体

抗人胼胝角蛋白抗体见张荣兴等^[10]。单抗 AE 1 由美国纽约大学医学中心孙同天教授惠赠,此单抗仅与 56.5 kd, 50/50' kd, 48 kd 和 40 kd 的酸性人角蛋白多肽反应^[7]。FITC-羊抗兔 IgG 和 FITC-兔抗鼠 IgG 由本库制备。

3. 培养细胞中间丝蛋白抽提方法见 Franke 等^[11]。

4. SDS-PAGE 方法按 Laemmli^[12],凝胶浓度为 10%。标准低分子量 Marker 来自 Pharmacia 公司。

5. 免疫印迹法见 Eichner 等^[13]。转移仪为:Bio-Rad transblot SD Semidry transfer Cell。单抗为 AE 1。显色试剂购自 Promega 公司。

6. 免疫荧光检测法见张荣兴等^[10]。第一抗体为 AE 1,第二抗体为 FITC-兔抗鼠 IgG。

7. 角蛋白丝结构转化观察使用间接法。第一抗体为兔抗人胼胝角蛋白抗体,第二抗体为 FITC-羊抗兔 IgG。0℃处理培养细胞的时间为 2—3 小时,然后固定染色。

结果与讨论

1. 不同上皮细胞系(株)交叉污染的 SDS PAGE 检测

我们用 SDS-PAGE 法分析了 BEL-7402, HeLa, A 431 和 HO-8901 四种癌细胞的中间丝蛋白的多肽组成,同时分析了不同上皮细胞实验交叉污染培养物的中间丝蛋白的多肽组成

* 中国科学院“八五”重点项目基金资助

** 南京大学生物系学生

(见图版 I 图 1)。结果表明,上述四种人癌细胞的中间丝蛋白大都在 45—57 kd 之间,其中 57 kd 可能是波形丝蛋白。HeLa 细胞与其他细胞的差别是它表达 40 kd 的角蛋白,而 A 431 细胞与其他细胞的差别主要是多一条 58 kd 的角蛋白。这两个标志角蛋白同样可在实验交叉污染的细胞培养物中检测出来(图版 I 图 1、3、6、8)。

2. 不同上皮细胞系(株)交叉污染的免疫印迹检测

在免疫印迹试验中所用的抗体为 AE 1 单抗。用作 SDS-PAGE 的材料为中间丝蛋白抽提物。我们用此法测定了 HeLa, BEL-7402 和 A 431 三种细胞及其相互交叉污染的细胞培养物。结果见图版 I 图 2。图版 I 图 2 中 1、3、6 分别为 BEL-7402, HeLa 和 A 431 细胞与单抗 AE1 反应的条带,分别为 50 kd, 40 kd 和 50 kd。图版 I 图 2 中 2、4、7 分别为 BEL-7402 + HeLa, HeLa + A 431 和 A 431 + BEL-7402 细胞实验交叉污染培养物与 AE 1 交叉的条带。结果表明,用此法可以测出 A 431 和 HeLa 细胞及 BEL-7402 和 HeLa 细胞的交叉污染,而测不出 A 431 和 BEL-7402 细胞间的交叉污染。

3. 不同上皮细胞系(株)交叉污染的免疫荧光检测

由于不同上皮细胞的角蛋白多肽组成不同,因而可以用不同交叉特征的抗角蛋白单抗测定上皮细胞系(株)间的交叉污染。使用间接免疫荧光法,我们用 AE 1 单抗测定了 A 431, HeLa 和 BEL-7402, SGC-7901 和 HO-8901 等五种上皮细胞,其中 A 431, HeLa 和 BEL-7402 细胞呈阳性反应,但阳性细胞所占比例不同,而 SGC-7901, HO-8901 为阴性。如果用 HeLa 或 A 431 细胞实验交叉污染 SGC-7901 细胞或 HO-8901 细胞,则用此法很易检验,且灵敏非常,污染率 $>10^{-4}$ (即 10^4 培养细胞中,污染细胞多于 1 个)时,即可检出,见图版 II 图 1、2。

4. 不同上皮细胞系(株)交叉污染的角蛋白丝结构转化检测

我们检测了四种上皮细胞: PcaSE-1, BEL-7404, CNE 和 HeLa。结果表明: PcaSE-1 和 BEL-7404 细胞在 0°C 处理 2 小时,约有 2% 左右细胞出现角蛋白丝结构转化,而用 0°C 处理 HeLa 细胞和 CNE 细胞时无此现象发生。相反, HeLa 和 CNE 细胞在有丝分裂过程中出现角蛋白丝结构转化,但 PcaSE-1 和 BEL-7404 细胞无此现象。见图版 II 图 3、4、5、6。

上述 4 种检测方法的依据主要是基于不同上皮细胞角蛋白丝的性质和多肽组成的差异。比较四种检测方法,我们认为 AE 1 单抗免疫荧光检测法较好。其一,此法操作比较简单;其二,此法灵敏,一般污染率 $>10^{-4}$, 甚至 10^{-5} 时也能检测出来。而 SDS-PAGE 法和免疫印迹法的能检出污染率一般在 10^{-1} — 10^{-2} 间,且操作也相对较麻烦。对于两种角蛋白丝结构转化检测而言, 0°C 处理引起的结构转化对不同上皮细胞交叉污染检测不是一个理想的方法,因为这种结构转化仅发生在 2% 左右的细胞中。而在有丝分裂过程的结构转化检测比 0°C 处理稍好一些,但由于分裂细胞占细胞总数的比例也不太高,因而也不是理想的方法。

但是,对上述检测方法的评价是相对而言的,如 AE 1 单抗免疫荧光法方便灵敏,但也有其缺陷。如它对 HeLa 和 A 431 细胞间交叉污染不能检测。因为二者均为阳性。相反,SDS-PAGE 和免疫印迹法却能检测 HeLa 和 A 431 细胞间的交叉污染,因为在 SDS-PAGE 法中,HeLa 细胞有 40 kd 多肽,而 A 431 细胞中没有,而 A 431 细胞的 58 kd 多肽在 HeLa 细胞中没有,因而很易区别。在免疫印迹法中,HeLa 细胞的 40 kd 多肽与 AE 1 单抗原起反应,而 A 431 细胞的 50 kd 多肽与 AE 1 单抗原起反应,区别明显。Quinlan, R.A. 等^[14]通过总结大量文献发表了人细胞和组织的角蛋白多肽谱,为上皮细胞系间交叉污染的鉴别提供

了大量的参考依据。因而,在检测不同上皮细胞系(株)交叉污染过程中,要根据不同上皮细胞的特点,选择不同的方法配合使用,才能获得较满意的结果。

摘 要

本文根据不同上皮细胞的角蛋白丝性质和多肽组成的差异,建立了四种不同上皮细胞系(株)间交叉污染的检测方法:1. SDS-PAGE法;2. 免疫印迹法;3. AE1单抗免疫荧光染色法;4. 角蛋白丝结构转化法。结果表明:方法1—3比较有用。我们认为,要获得较满意的检测结果,需要根据不同上皮细胞的特点,选择不同的方法配合使用。

关键词: 上皮细胞 交叉污染 角蛋白丝

参 考 文 献

- [1] Gartler, S. M. et al., 1968, *Nature* (London), 217: 750—751.
[2] Lavappa, K. S. et al., 1976, *Nature* (London), 259: 211—213.

- [3] Lavappa, K. S., 1978, *In Vitro*, 14: 469—475.
[4] Nelson-Rees, W. A. et al., 1974, *Science* (Washington, DC), 184: 1093—1097.
[5] Lynch, M. H. et al., 1989, *J. Cell Biol.*, 103: 2593—2606.
[6] Dhouailly, D. et al., 1989, *Exp. Cell Res.*, 181: 141—158.
[7] Cooper, D. et al., 1985, *Lab. Invest*, 52 (3): 243—256.
[8] Schliwa, M. et al., 1979, *Exp. Cell Res.*, 143: 281—290.
[9] Hoswitz, B. et al., 1981, *Exp. Cell Res.*, 143: 281—290.
[10] 张荣兴、潘玉芝, 1988, *实验生物学报*, 21(4): 493—503.
[11] Franke, W. W., et al., 1979, *J. Cell Biol.*, 81(3): 570—580.
[12] Laemmli, V., 1970, *Nature*, 227: 680—685.
[13] Eichner, R., et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98: 1388—1396.
[14] Quinlan, R. A. et al., 1985, *Annals of The New York Academy of Sciences*, 455: 282—306.

DETECTION OF CROSS-CONTAMINATION BETWEEN DIFFERENT HUMAN EPITHELIAL CELL LINES

ZHANG Rong Xing SHI Shuang Ping ZHU De Hou GE Xi Rui
(Shanghai Institute of Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT

Based on differences in characteristics and composition of polypeptides of keratin filaments in human epithelial cell lines, we established four methods to detect cross-contamination between different epithelial cell lines: 1. SDS-PAGE of keratins, 2. Western blot with AE1 monoclonal antibody against keratins, 3. Immunofluorescence staining with AE1 antibody, and 4. Structural transformation of keratin filaments. The results indicate that methods 1—3 are more useful. In order to get satisfactory detection, it must choose combination of several methods according to the properties of the respective epithelial cells.

Key words: Epithelial cell Cross-contamination Keratin filament